

**FILIPA RAQUEL ASSUNÇÃO POÇAS DE ALMEIDA
ROCHA**

**ESTABILIDADE TÉRMICA DE PROTEÍNAS NA
PRESENÇA DE LÍQUIDOS IÓNICOS**

Orientadora: Prof.^a Doutora Tânia Santos de Almeida

Co-Orientadora: Prof.^a Doutora Joana Mota

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Escola de Ciências e Tecnologias da Saúde

Lisboa

2017

**FILIPA RAQUEL ASSUNÇÃO POÇAS DE ALMEIDA
ROCHA**

**ESTABILIDADE TÉRMICA DE PROTEÍNAS NA
PRESENÇA DE LÍQUIDOS IÓNICOS**

Dissertação defendida em provas públicas na
Universidade Lusófona de Humanidades e
Tecnologias no dia 4 de Dezembro de 2017,
perante o júri, nomeado pelo Despacho de
Nomeação n.º: 395/2017 de 17 de Novembro,
com a seguinte composição:

Presidente:

Professora Dulce Santos

Vogais:

Professor Doutor Nuno Saraiva – Arguente

Professora Ana Mirco

Orientador:

Professora Doutora Tânia Santos de Almeida

**Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias
Escola de Ciências e Tecnologias da Saúde**

Lisboa

2017

**Uma corrida não é para o que chega mais depressa,
mas sim para o que continua sempre a correr...**

Agradecimentos

A dissertação, o culminar de uma das etapas mais marcantes da vida universitária, quero deixar em primeiro lugar, o meu agradecimento às minhas orientadoras, Professora Tânia Almeida e Professora Joana Mota.

Seria impossível agradecer-lhes só pelo apoio incondicional que me deram durante a dissertação, há sem dúvida um obrigada muito mais antigo para dizer. Um obrigada pela oportunidade de ter integrado o grupo de investigação, outro pela oportunidade de ter sido monitora e um obrigada ainda maior por terem acreditado nas minhas capacidades desde o início e ao mesmo tempo conseguirem mostrar-me os aspetos que tinha a melhorar. A verdade é que para além do que desenvolvi a nível profissional com o vosso apoio, foram das melhores Professoras que tive a ensinar-me e a preparar-me para a vida. Obrigada!

Tenho igualmente que agradecer aos meus dois pilares da Universidade, à Margarida Crispim e à Rita Caparica. Se hoje estou a entregar esta dissertação também o devo a elas, a todas as noites de estudo, a todo o companheirismo e ao quanto cresci com elas. Percebi assim mais um dos valores da amizade, uma ajuda que é dada de forma tão genuína e espontânea sem pedidos e sem procura de obter nada em troca.

Obrigada Margarida, por todas as tardes em que estiveste a escrever a tua dissertação (que só tinhas que entregar daqui a meses) ao meu lado, para eu ter o apoio e a motivação que precisava. Obrigada Rita por seres a minha companheira até ao último minuto e por saberes onde falho e preencheres esses espaços sem hesitares.

Por fim, agradeço à minha família, por nunca questionar as horas de ausência, por me apoiar em todas as decisões que tomei e por me receber sempre com um sorriso e com a força que precisei, todos os dias.

Obrigada por me deixarem traçar o meu futuro, mas fazendo-me sempre sentir que são uma muralha nas minhas costas que nunca me deixa cair.

Resumo

As proteínas são biomoléculas que apresentam um grande potencial farmacológico. No entanto, são também conhecidas pela sua instabilidade quando expostas a determinadas condições, como alterações à temperatura e pH ótimos, que podem comprometer a sua utilização em formulações farmacêuticas.

Neste contexto, a procura de alternativas que auxiliem a estabilidade destas moléculas é uma constante, e a adição de determinados co-solventes pode representar uma solução. Neste trabalho experimental, foi estudada a estabilidade térmica de proteínas, utilizando três líquidos iónicos (LI) como potenciais co-solventes estabilizadores. Como proteína modelo utilizou-se a lisozima, e os líquidos iónicos estudados foram o Brometo de 1-hexil-3-Metilimidazolio – [C6mim][Br], que pertence aos derivados de imidazol, o (2-Hidroxietil)-trimetilamonio-L-fenilalaninato – [Cho][Phe] – e o (2-Hidroxietil)-trimetilamonio-L-glutamato – [Cho][Glu], que pertencem aos derivados de colina.

Foram realizados ensaios de estabilidade onde várias soluções de lisozima contendo LI foram expostas a diferentes temperaturas, nomeadamente 60 °C e 90 °C, durante diferentes intervalos de tempo. Os resultados demonstram, tal como esperado, que a lisozima perde atividade sempre que é exposta a temperaturas elevadas, no entanto em soluções que contêm LI apresentam taxas de recuperação de atividade enzimática mais elevadas do que na ausência dos mesmos.

Em conclusão, os resultados obtidos mostram que a utilização de LI como co-solventes estabilizadores de proteínas é promissor, embora sejam necessários mais estudos para reconhecer as propriedades físico-químicas dos LI que melhor auxiliam a estabilidade proteica.

Palavras Chave: Proteína; Líquidos Iónicos; Estabilidade Térmica, influência do pH.

Abstract

Proteins are biomolecules that present a great pharmacological potential. However, they are also known for their instability when exposed to certain conditions, such as alterations to the optimal temperature and pH, which may compromise their use in pharmaceutical formulations. Thus, the search for alternatives that help the stability of these molecules is a constant, and the addition of co-solvents may represent a solution.

In this experimental work, the thermal stability of proteins was studied, using three ionic liquids as potential stabilizing co-solvents. As the model protein used was lysozyme and the ionic liquids (IL) studied were 1-hexyl-3-methylimidazolium bromide [C6mim][Br], derived to imidazole derivatives, and two ionic liquids derived from choline, the (2-hydroxyethyl) -Trimethylammonium-L-phenylalaninate - [Cho][Phe] - and the (2-Hydroxyethyl) -trimethylammonium-L-glutamate - [Cho][Glu].

Stability tests were performed where several solutions containing Lysozyme and IL were exposed at different temperatures, namely 60 °C and 90 °C, during different time intervals. The results demonstrate that, as expected, lysozyme loses activity whenever exposed to high temperatures. Nevertheless, solutions containing ILs have higher recovery rates of enzymatic activity than without the presence of these liquids.

In conclusion, the results show that the use of ILs as protein stabilizing co-solvents is promising, although further studies are needed to recognize the physicochemical properties of the ILs that best aid protein stability.

Key Words: Protein; Ionic Liquids; Thermal Stability; pH influence.

Abreviaturas e Símbolos

%	Percentagem
°C	Grau Celcius
λ	Comprimento de onda
®	Marca Registada
μg	Micrograma
BCA	<i>Bicinchoninic acid assay</i>
biH ₂ O	Água Bidestilada
[C6mim][Br]	Brometo de 1-hexil-3-Metilimidazolio
[Cho][Phe]	(2-Hidroxietil)-trimetilamonio-L-fenilalaninato
[Cho][Glu]	(2-Hidroxietil)-trimetilamonio-L-glutamato
DPR	Desvio Padrão Relativo
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
g	Grama
H	hora
IL	Ionic Liquid (Líquido Iónico)
ILs	Ionic Liquids (Líquidos Iónicos)
kDa	kilodalton
LI	Líquido Iónico
Min	Minuto
mL	Mililitro
mg	Miligrama
nm	Nanómetro
PBS	Phosphate buffer Solution (Solução de Tampão Fosfato)
R ²	Coefficiente de correlação
rpm	Rotações por minuto
t	Tempo
T	Temperatura
T amb	Temperatura Ambiente
U/mg	Unidade por miligrama
UV	Ultravioleta
v	Volume

Índice

Índice de Tabelas	9
Índice de Figuras	10
Introdução	11
Proteínas	13
Estrutura das Proteínas	13
Funções das Proteínas	15
Áreas de Interesse Terapêutico e Novos Desafios das Proteínas	16
Estabilidade Física e Química das Proteínas	18
A influência da Desnaturação Térmica	20
A influência do pH	22
Enzimas	24
Lisozima	25
Líquidos Iónicos	27
Classificação dos Líquidos Iónicos	29
Aplicabilidade dos Líquidos Iónicos como Ingredientes Funcionais	31
Capítulo I: Materiais e Métodos	33
1.1 Materiais	34
1.2 Reagentes	34
1.3 Métodos	35
1.3.1 Validação do Método Analítico	35
1.3.2 Ensaio de Estabilidade	36
1.3.2.1 Preparação de soluções	36
1.3.2.2 Estabilidade térmica	37
1.3.2.3 Doseamento proteico	38
1.3.2.4 Atividade biológica do sistema	39
1.3.2.5 Determinação do pH	39

Capítulo II: Resultados e Discussão	40
2.1 Validação do Método Analítico	41
2.2. Ensaaios de estabilidade	43
2.2.1 Ensaio de estabilidade prolongada – Ensaio 1	43
2.2.2 Ensaio de estabilidade acelerada – Ensaio 2	45
2.2.3 Ensaio de estabilidade acelerada – Ensaio 3	47
2.2.4 Efeito do solvente na estabilidade da proteína	49
Conclusão	51
Bibliografia	53

Índice de Tabelas

Tabela 1. Soluções de lisozima E, F, G e H em água bidestilada e LI, utilizadas no ensaio de estabilidade térmica 1 e 2.

Tabela 2. Soluções de lisozima I e J em tampão fosfato pH 7,4 e LI, utilizadas no ensaio de estabilidade térmica 3.

Tabela 3. Soluções controlo e soluções branco utilizadas nos ensaios de estabilidade térmica 1, 2 e 3.

Tabela 4. Dados de temperatura, duração, solvente e soluções estudadas em cada um dos ensaios de estabilidade térmica 1, 2 e 3.

Tabela 5. Valores da média da taxa de recuperação para cada uma das soluções as soluções A, B, C e D, utilizadas para aferir o método da exatidão.

Tabela 6. Valores da média da taxa de recuperação e DPR para as soluções B e D que foram obtidos para a análise do parâmetro precisão.

Tabela 7. Valores da média da taxa de recuperação e DPR para as soluções B e D que foram obtidos para a análise do parâmetro de repetibilidade.

Tabela 8. Valores de atividade antes e após exposição à temperatura de 60 °C e valores da taxa de recuperação enzimática, das soluções do ensaio de estabilidade 1.

Tabela 9. Valores de atividade antes e após exposição à temperatura de 90 °C e valores da taxa de recuperação enzimática, das soluções do ensaio de estabilidade 2.

Tabela 10. Valores de atividade antes e após exposição à temperatura de 90 °C e valores da taxa de recuperação enzimática, das soluções do ensaio de estabilidade 3.

Tabela 11. Determinações do valor de pH para as soluções controlo, com o LI [Cho][Phe] e com o LI [Cho][Glu] em água bidestilada e em tampão fosfato pH 7,4.

Tabela 12. Valor de atividade das soluções estudadas, no ensaio 1, 2 e 3, à temperatura ambiente.

Índice de Figuras

Figura 1 – Esquema representativo de uma proteína a) no estado nativo, apresentando as suas pontes de hidrogénio; e b) de uma proteína no estado desnaturado.

Figura 2 – Esquema representativo de uma nitroporina a) na estrutura fechada e b) na estrutura fechada.

Figura 3 – Número de publicações de ensaio de proteína, em diversas fases, com a aplicação de líquidos iónicos desde o ano de 2002 até ao ano de 2009.

Figura 4 – Aplicabilidades dos líquidos iónicos em diversas vertentes.

Figura 5 – Exemplo de um catião e de um anião que compõem um líquido iónico da segunda geração.

Figura 6 – Exemplo de um catião e de vários aniões que compõem os líquidos iónicos da terceira geração.

Figura 7 – Esquema do procedimento do ensaio do doseamento proteico.

Figura 8 – Equação que determina o valor da atividade enzimática da lisozima.

Figura 9 - Gráficos representativos da cinética enzimática, a) $t = 0$ h com e sem adição de líquidos iónicos e a 25 °C; b) $t = 24$ h com e sem adição de líquidos iónicos e a 60 °C.

Figura 10 – Gráficos representativos da cinética enzimática, a) $t = 0$ h com e sem adição de líquidos iónicos e a 25 °C; b) $t = 4$ h com e sem adição de líquidos iónicos e a 90 °C.

Figura 11 – Gráficos representativos da cinética enzimática, a) $t = 0$ h com e sem adição de líquidos iónicos e a 25 °C; b) $t = 1,5$ h com e sem adição de líquidos iónicos e a 90 °C.

Introdução

Atualmente, as terapias que assentam na utilização de proteínas desfrutam de um reconhecimento e potencial elevado, estando estas moléculas em foco de inúmeros estudos nas últimas décadas (Bak et al., 2015; Dimitrov, 2012; Noritomi, Minamisawa, Kamiya, & Kato, 2011). Este interesse advém de várias causas como o facto de estas moléculas possuírem elevada atividade farmacológica (Bak et al., 2015; Dimitrov, 2012) nomeadamente, na substituição de proteínas não-funcionais, no aumento da produção proteica a nível celular ou na aquisição de novas funções (Dimitrov, 2012).

As vantagens da utilização de proteínas são claras e sustentadas por dois pilares de extrema importância, por onde se regem as autoridades capazes de aprovar a comercialização de medicamentos. São estes a segurança e a eficácia (Dimitrov, 2012; Frokjaer & Otzen, 2005).

Relativamente à segurança, o sucesso da terapêutica com proteínas baseia-se no uso de conceitos e metodologias que tendem a minimizar os efeitos secundários provenientes das interações destas com os alvos pretendidos, como acontece aquando da superestimulação, ou como resultado de interações com outros alvos que não os pretendidos, podendo surgir reações de hipersensibilidade (Dimitrov, 2012).

A imunogenicidade, ou seja, a capacidade de um antigénio induzir uma resposta imune (Victor W. Rodwell, David A. Bender, Kathleen M. Botham, Peter J. Kennelly, 2016), é um dos parâmetros que dita a segurança terapêutica das proteínas. Apesar de existirem estudos que demonstram alguma imunogenicidade por parte destas moléculas, no geral, a sua estrutura, a sua biocompatibilidade e especificidade permitem-lhes apresentar um perfil de segurança superior ao de outras moléculas farmacologicamente ativas (Bak et al., 2015; Dimitrov, 2012)

Quando nos referimos à eficácia, as proteínas estão descritas como altamente eficazes pois exibem uma grande potência e seletividade, no entanto, existem alguns desafios neste âmbito como é o caso, da baixa biodisponibilidade oral e a fraca permeabilidade nas membranas biológicas (Bak et al., 2015; Dimitrov, 2012). No entanto, para que seja mantida a integridade, existem desafios no âmbito da estabilização destas macromoléculas uma vez que, vários estudos as descrevem como sensíveis a condições externas, tais como a temperatura, o pH, a presença de iões metálicos, a presença de superfícies hidrofóbicas, entre outras, havendo a necessidade

de encontrar formas de manter a sua estrutura nativa (Dimitrov, 2012; Frokjaer & Otzen, 2005, Jr & Vickery, 2001; Murphy, 2001)

Proteínas

Estrutura das Proteínas

As proteínas são constituídas por cadeias polipeptídicas que têm como unidades base os aminoácidos que estabelecem contacto entre eles através de ligações peptídicas. Dado que existem 20 aminoácidos diferentes, a proteína adquire a sua forma dependendo do número e da posição de cada aminoácido na sua constituição. A esta organização, dá-se o nome de **estrutura principal** da proteína (Rod R. Seeley, Trent D. Stephens, 2013; Weil, 2000). No entanto, a proteína adquire uma forma tridimensional, forma essa que, é estabelecida através de outro tipo de ligações não peptídicas que lhe permite adquirir uma **estrutura secundária, terciária** e até **quaternária** (Weil, 2000).

O tipo de interações que podem existir entre os monómeros de proteínas são: as ligações de dissulfureto que são interações entre dois resíduos de cisteína que pertencem à mesma cadeia ou a duas cadeias diferentes; as ligações iónicas que se estabelecem entre um ião de carga positiva e um ião de carga negativa e que podem ser criadas, dentro da mesma cadeia peptídica, entre duas cadeias peptídicas ou ainda entre uma cadeia e outra molécula; existem ainda as ligações de hidrogénio ou pontes de hidrogénio que são estabelecidas não covalentemente entre átomos de oxigénio e átomos de hidrogénio nas cadeias pépticas e que geralmente se estabelecem numa mesma cadeia permitindo uma aproximação que possibilita outro tipo de interações; as interações hidrófobas que estão presentes apenas em proteínas que na sua constituição tem aminoácidos com cadeias laterais hidrófobas, não havendo nestes casos ligações de hidrogénio, o que acaba por resultar numa repulsão e originar interações designadas como forças de *Van der Waals* (Weil, 2000).

A **estrutura secundária** depende das ligações de hidrogénio ou pontes de hidrogénio que permitem à proteína enrolar-se formando estruturas helicoidais ou folhas pregueadas. Geralmente a perda de função de uma proteína ocorre quando há quebra das

pontes de hidrogénio como consequência do aumento de temperatura ou de alterações de pH (Rod R. Seeley, Trent D. Stephens, 2013).

Por sua vez, a **estrutura terciária** não é mais do que o reajuste da estrutura secundária com base na polaridade da molécula. Isto é, as zonas polares da proteína mantêm-se com maior desdobramento para garantir maior área de contacto com as moléculas de água e as zonas apolares apresentam um maior enrolamento, assumindo uma conformação globular, para que o contacto com as moléculas de água seja menor. (Rod R. Seeley, Trent D. Stephens, 2013)

Para além do reajuste em consequência da polaridade da molécula, as ligações de dissulfureto também são relevantes para a estrutura terciária da proteína na medida em que permitem que várias zonas da proteína possam ligar-se de forma covalente. Para além de que em colaboração com as pontes, podem juntar duas partes de uma cadeia que estão longe uma da outra, permitindo formar outras sequências de aminoácidos (Jr & Vickery, 2001; Murphy, 2001; Rod R. Seeley, Trent D. Stephens, 2013)

Ainda no que diz respeito à estrutura terciária das proteínas esta define o local e a forma do centro ativo, ou seja, demarca uma sequência de 100 a 200 aminoácidos onde se localiza a zona funcional da proteína. Note-se que a função de uma proteína pode não estar associada ao centro ativo, pode ser exclusiva de um centro ativo ou pode advir de um conjunto de vários centros ativos (Rod R. Seeley, Trent D. Stephens, 2013).

Deste modo, a perda de função da proteína está relacionada com a perda da conformação do centro ativo. Este efeito ocorre caso existam alterações estruturais consequentes da quebra de ligações ou de interações estabelecidas na própria proteína (Rod R. Seeley, Trent D. Stephens, 2013).

Finalmente, a **estrutura quaternária** tem por base a organização espacial entre duas ou mais proteínas para formar uma unidade funcional sendo que, cada uma das proteínas que lhe dá origem designa-se subunidade, no entanto, nem todas as proteínas adquirem esta estrutura (Rod R. Seeley, Trent D. Stephens, 2013). Um dos exemplos de proteínas que possuem estrutura quaternária são algumas enzimas, sendo esta estrutura importante na regulação da sua própria atividade (Weil, 2000).

Assim sendo, é evidente a influência da organização estrutural das proteínas na manutenção das suas funções, tornando-se imperativo de seguida, compreender mais profundamente essas funcionalidades.

Funções das Proteínas

As proteínas desempenham várias funções nomeadamente, participam na regulação de processos orgânicos no corpo humano tanto a nível intracelular como extracelular. Assim, as suas funções podem ser categorizadas em 7 grupos: proteínas de catálise, de estrutura, de movimento, de defesa, de regulação, de transporte e de armazenamento (Quintas & Ana Ponces Freire, 2008; Rod R. Seeley, Trent D. Stephens, 2013).

As **proteínas de catálise** são enzimas que aceleram reações bioquímicas como no caso do complexo multienzimático de transformação piruvato em acetilcoenzima A. Note-se que, uma enzima pode aumentar a velocidade de uma reação de um fator de 10^6 para 10^{12} (Quintas & Ana Ponces Freire, 2008; Rod R. Seeley, Trent D. Stephens, 2013). As **proteínas de estrutura** estão ligadas à proteção e ao suporte, como é o caso das fibras de colagénio que formam muitas estruturas de suporte no corpo humano e o caso da queratina que assegura a resistência da pele, cabelo e unhas (Quintas & Ana Ponces Freire, 2008; Rod R. Seeley, Trent D. Stephens, 2013).

No caso das **proteínas de movimento** tal como o nome indica, estão relacionadas com o movimento, exemplo disso é a actina e a miosina, duas proteínas presentes nos músculos e responsáveis pelas contrações musculares (Quintas & Ana Ponces Freire, 2008; Rod R. Seeley, Trent D. Stephens, 2013).

O sistema imunitário também é provido de proteínas que asseguram a defesa contra microrganismos e substâncias estranhas, os anticorpos, que são moléculas importantes para o sistema imunitário. Por esta razão, existem proteínas classificadas como **proteínas de defesa** (Quintas & Ana Ponces Freire, 2008; Rod R. Seeley, Trent D. Stephens, 2013)

As **proteínas de regulação** estão envolvidas em processos de crescimento e diferenciação como é o caso das hormonas, mas também estão envolvidas em processos fisiológicos como a insulina que é responsável pela regulação do transporte de glicose para as células (Quintas & Ana Ponces Freire, 2008; Rod R. Seeley, Trent D. Stephens, 2013).

Por sua vez, existem proteínas responsáveis por transportar outras moléculas para vários locais no organismo. Temos como exemplo a hemoglobina que é uma proteína cuja função é transportar oxigénio e dióxido de carbono no sangue, as proteínas do plasma cuja função é levarem substâncias para a circulação e as proteínas da membrana plasmática das células controlam o movimento de substância do exterior para o interior da célula. Todas estas são classificadas como **proteínas de transporte** (Quintas & Ana Ponces Freire, 2008; Rod R. Seeley, Trent D. Stephens, 2013).

Finalmente, as **proteínas de armazenamento** têm como função conservar nutrientes essenciais. Exemplo disso é a ceroplasmina, proteína produzida no fígado e que armazena o cobre. (Quintas & Ana Ponces Freire, 2008; Rod R. Seeley, Trent D. Stephens, 2013; Weil, 2000).

Assim, torna-se inegável as diversas e valiosas as funcionalidades destas moléculas o que suporta a sua relevância no desenvolvimento de novas terapias.

Áreas de Interesse Terapêutico e Novos Desafios das Proteínas

Até agora, já foram identificadas mais de 7000 péptidos com importância fisiológica humana e por isso, o interesse na pesquisa e desenvolvimento farmacêutico destas moléculas aumentou exponencialmente (Fosgerau & Hoffmann, 2015). Isto é comprovado pelos números que se seguem registando-se, em 2015 mais de 60 medicamentos peptídicos que chegaram ao mercado aprovados pela FDA (*Food and Drug Administration*), 140 terapêuticas estão em ensaios clínicos e mais de 600 terapêuticas estão em ensaios pré-clínicos (Fosgerau & Hoffmann, 2015).

Há que notar, que para além do aumento do número de terapêuticas, o barómetro financeiro também demonstra o crescimento desta área, no que diz respeito à

comercialização de medicamentos atualmente já aprovados, prevendo-se um aumento de 14,1 bilhões de dólares em 2011 para um valor de 25,8 bilhões de dólares em 2018 e um aumento de 8,6 bilhões de dólares para 17,0 bilhões de dólares em novos medicamentos com base peptídica, neste mesmo período (Fosgerau & Hoffmann, 2015).

As áreas que suscitam maior desenvolvimento são as doenças metabólicas e a oncologia, a primeira surge pelo aumento da população com obesidade e com diabetes tipo 2 e a segunda pela mortalidade que advém da doença oncológica bem como a necessidade de uma resposta terapêutica substituta à quimioterapia (Fosgerau & Hoffmann, 2015).

No entanto, mais áreas de interesse têm surgido, sendo que a indústria farmacêutica tem também direcionado os seus estudos para doenças raras e medicamentos órfãos, sendo exemplo de um fármaco comercializado, o agonista do recetor da somatostatina para o tratamento da síndrome de *Cushing* (Fosgerau & Hoffmann, 2015).

Além dos casos acima apresentados, as áreas das doenças infecciosas e inflamatórias também são áreas de estudo em crescimento pois vários péptidos estão a ser submetidos a ensaios clínicos (Fosgerau & Hoffmann, 2015).

Os novos desafios terapêuticos passam por exemplo, por alternativas à via de administração, a maioria dos medicamentos são administrados via parenteral, sendo que 75% destes, são injetáveis. Assim, e para que exista uma maior *compliance* por parte dos doentes, é necessário procurar alternativas como a via oral, intranasal e transdérmica, apesar de já existirem alguns estudos sobre esta matéria (Fosgerau & Hoffmann, 2015).

Estudos já demonstraram que as estratégias da via oral passam por estabilizar as estruturas secundária pela construção de zonas hidrofóbicas, pelo estabelecimento de pontes de hidrogénio, por processos de metilação, entre outras alterações que garantam que a degradação ácida e enzimática do trato gastrointestinal é minimizada (Fosgerau & Hoffmann, 2015).

Para superar estes desafios e outros como, a baixa permeabilidade das proteínas nas membranas celulares, a toxicidade a elevadas concentrações e o tempo de semi-vida, começaram a surgir novos sistemas de veiculação (Manning, Chou, Murphy, Payne, & Katayama, 2010).

No leque destes novos sistemas de veiculação, encontram-se por exemplo, os sistemas de encapsulação como as nanopartículas - com polímeros biodegradáveis, com ácido poli-láctico, com lípidos sólidos e de quitosano - os lipossomas, lipossomas PEGilados, niossomas e os aquossomas. Estão também a ser desenvolvidos outros sistemas como hidrogéis e sistemas transdérmicos (Jain et al., 2013).

Todos os sistemas referidos permitem uma libertação mais controlada dos fármacos e auxiliam-nos a atravessar barreiras celulares, sendo que, de uma forma geral, as diferenças entre os vários sistemas de veiculação são a nível da sua composição, para que existam sempre alternativas de acordo com as diferentes propriedades físico-químicas das proteínas (Jain et al., 2013).

No que respeita à alteração e otimização do *design* das proteínas, os estudos devem direccionar-se para a investigação de péptidos multifuncionais, péptidos com alta penetração intracelular e péptidos conjugados com outras moléculas (Fosgerau & Hoffmann, 2015).

Por fim, os desafios quanto à formulação - *rational design of peptide therapeutic* - são fundamentalmente no caso das formulações líquidas em que é importante identificar os aminoácidos lábeis que podem sofrer alterações químicas, como a oxidação, e ainda na melhoria das propriedades físico-químicas da própria solução para evitar problemas de estabilidade (Fosgerau & Hoffmann, 2015)

Estabilidade Física e Química das Proteínas

A estabilidade é um parâmetro fundamental tido em conta durante a produção, o acondicionamento e armazenamento de todos os fármacos, e as proteínas não são exceção (Manning et al., 2010).

A preocupação na manutenção da estabilidade está relacionada com a instabilidade física e química das proteínas. A instabilidade física, como próprio nome indica, refere-se aos processos em que ocorrem alterações ao seu estado físico, mas em que a composição química da proteína se mantém inalterada. Por sua vez, a instabilidade química envolve todos os processos que originam a quebra ou formação de ligações que possam originar alteração da forma química da molécula (Manning et al., 2010).

Assim, para garantir a estabilidade do modelo proteico a manipular é fundamental compreender tanto os fatores físicos como os químicos que podem alterar a sua estabilidade (Manning et al., 2010).

A **estabilidade física** das proteínas depende de vários mecanismos nomeadamente, da superfície de adsorção da proteína, da sua agregação, precipitação e desnaturação. (Manning et al., 2010).

A adsorção à superfície está intimamente ligada ao contacto das proteínas com os diversos materiais durante os processos de manipulação, sendo que esse contacto físico pode levar a perdas significativas de massa mas também, à alteração da conformação da molécula. Por sua vez, a agregação tem um mecanismo idêntico ao da adsorção mas é restrita a soluções. Apresenta-se como um contacto excessivo entre várias proteínas que se encontram numa mesma solução. (Manning et al., 2010).

No limite, esta agregação pode tornar-se macroscópica, derivada de uma agregação maximizada ou do facto da proteína exceder o limite da solubilidade. A este fenómeno dá-se o nome de precipitação (Manning et al., 2010).

Finalmente, a desnaturação descreve-se como a perda da estrutura globular ou tridimensional da proteína, sendo que esta é a estrutura que a proteína adquire na forma nativa. Quando este fenómeno acontece, a proteína altera o seu estado físico, perdendo a estrutura terciária, a estrutura secundária ou ambas (Manning et al., 2010).

Por outro lado, a **instabilidade química** depende de vários fatores tais como o meio aquoso, a salinidade, as interações iónicas e o pH entre outros (Lindman et al., 2006).

Relativamente à salinidade, os sais neutros intervêm e estabilizam as proteínas consoante a sua concentração e a carga dos iões, ou seja, dependem da força iónica. É utilizado com frequência sais como o cloreto de sódio, o sulfato de amónio, o fosfato de sódio e o de potássio para aumentar a solubilidade das proteínas (Campos, 2005).

A força iónica nas soluções proteicas deve ser baixa para se observar um efeito dissolvente dado que no caso da força iónica ser elevada (soluções salinas concentradas) verifica-se a precipitação das moléculas proteicas (Campos, 2005).

No que respeita às interações iónicas, a repulsão resultante de interações de cargas iguais, bem como a atração por cargas opostas tem uma enorme influência no

estado de desdobramento proteico que, como o já visto anteriormente, pode afetar a estabilidade. No entanto, estes acontecimentos dependem do meio envolvente, pois estão descritas situações em que a estabilidade das proteínas foi alterada pelas cargas de superfície e outras em que as cargas foram removidas sem afetar a sua estabilidade geral (Lindman et al., 2006).

Finalmente, o pH do meio é outro fator de extrema relevância pois muitas das propriedades das proteínas, como a atividade e a estabilidade dependem do pH e no caso de existirem alterações no meio a integridade proteica pode ser posta em causa (Talley & Alexov, 2010).

Na manipulação de proteínas tanto a temperatura como o pH são parâmetros que muitas vezes têm que ser ajustados, por isso deve compreender-se os efeitos da desnaturação térmica (instabilidade física) e do pH da solução (instabilidade química) na estabilidade proteica.

A influência da Desnaturação Térmica

No que diz respeito à desnaturação, a térmica é o processo mais comum. Caracteriza-se pela perda da estrutura proteica originada pela exposição a temperaturas que são consideradas fora do intervalo da temperatura ótima para a proteína (Bischof & He, 2005).

A perda da estrutura tridimensional é o suficiente para causar a perda da função de uma proteína, no entanto, o estado desnaturado não é necessariamente correspondente ao desdobramento completo da proteína. Geralmente a desnaturação das proteínas deve-se a um conjunto de estados parciais de desdobramento da sua estrutura (Nelson & Cox, 2014)

O aumento de temperatura influencia a fração de desdobramento da proteína. Adicionalmente, na transição térmica entre o estado nativo e o estado de desdobramento total, existe ainda a hipótese da reversibilidade deste desdobramento, que diminui à medida que a temperatura aumenta. Assim, a desnaturação pode ser classificada como reversível ou irreversível (Bischof & He, 2005; Manning et al., 2010)

Regra geral, a reversibilidade da estrutura ocorre quando há o processo de desnaturação a baixas temperaturas, onde a quebra de ligações não ocorre no esqueleto

principal da molécula, ou seja, não envolvendo a quebra de ligações peptídicas. (Bischof & He, 2005; Manning et al., 2010)

No caso da desnaturação a elevadas temperaturas, esta tem efeitos complexos nas interações fracas da proteína, nomeadamente nas pontes de hidrogénio, **Figura 1**. No caso de o aumento da temperatura ser lento, a conformação da proteína no geral mantém-se intacta até que, num determinado intervalo de valores de temperatura, ocorre a perda abrupta da estrutura e consequentemente da sua função (Nelson & Cox, 2014). Essa mudança abrupta indica que o desdobramento pode ser um processo cooperativo, em que a perda de estrutura numa zona da proteína pode destabilizar o resto da proteína (Nelson & Cox, 2014).

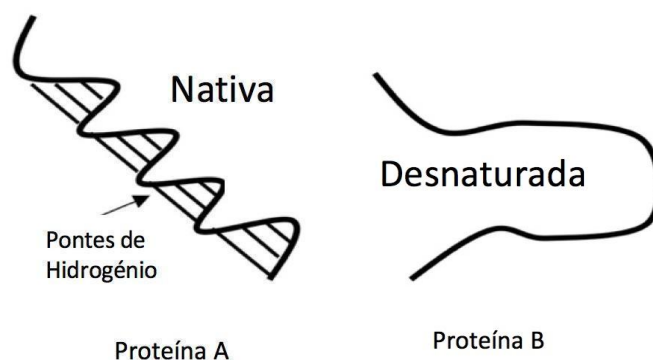


Figura 1 – Esquema representativo de uma proteína **a)** no estado nativo, apresentando as suas pontes de hidrogénio; e **b)** de uma proteína no estado desnaturado (Adaptado de Bischof & He, 2005).

Ainda assim, os efeitos do aquecimento nas proteínas não são podem ser padronizados, por exemplo, existem proteínas que apenas são funcionais à temperatura ambiente, enquanto outras são termorresistentes e a 100 °C mantêm a sua estrutura e a sua função (Nelson & Cox, 2014).

Em muitos dos processos de formulação e produção de proteínas é utilizado o aumento térmico, o qual pode resultar num problema de estabilidade, se não for controlado (Noritomi et al., 2011). Atualmente, já existem algumas formas de minimizar este problema. No entanto, apesar da desnaturação proteica ser mais reduzida muitas das vezes os agentes estabilizadores utilizados não são os mais estáveis a elevadas temperaturas nem os mais eficazes pois não previnem a agregação (Noritomi et

al., 2011), o que continua a ser um problema nas estratégias atualmente utilizadas para a estabilização de proteínas a temperaturas elevadas.

Adicionalmente, outro fator que tem uma grande influência na estabilidade das proteínas é o pH da solução. Pelo que é vital encontrar formas de ultrapassar estas duas limitações.

A influência do pH

O pH pode influenciar a estrutura de uma proteína de forma notável, dependendo das características da mesma. As proteínas podem tolerar pequenas flutuações do pH do meio, no entanto quando as alterações são significativas, a conformação da proteína é alterada (Talley & Alexov, 2010).

As alterações acima referidas, podem estar relacionadas com a interações dos aminoácidos terminais que constituem a proteína e o com o meio. Os resíduos de aminoácidos ionizáveis demonstraram desempenhar papéis importantes na ligação das proteínas a outras moléculas, nos mecanismos enzimáticos bem como, influenciam a sua estrutura, a estabilidade e a solubilidade (Di Russo, Estrin, Martí, & Roitberg, 2012).

Os tipos de interações que as cadeias laterais terão com o ambiente dependem do seu estado de protonação. Os valores de pKa fortemente alterados têm como consequência a mudança na protonação dos aminoácidos, o que indica que a estabilidade das proteínas depende do pH. Os fatores que afetam os valores do pKa são as interações iónicas, as interações ião-dipolo, que incluem as pontes de hidrogénio, entre outras (Di Russo et al., 2012).

Um exemplo de uma alteração da estrutural dependente do pH é o caso das nitroporinas. A pH 7,5, estas proteínas apresentam uma conformação fechada porque o Aspartato na posição 30 é protonado e interage com a Leucina da posição 130 através da formação de uma ponte de hidrogénio. No entanto quando o pH do meio baixa para 5,5, o Aspartato é ionizado, e a estrutura é alterada tornando-se mais aberta, **Figura 2** (Di Russo et al., 2012).

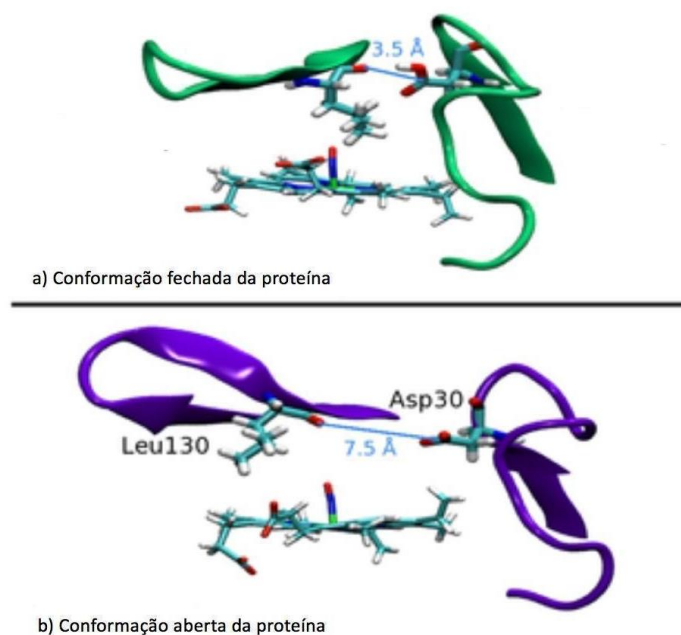


Figura 2 – Esquema representativo de uma nitroporina **a)** na estrutura fechada e **b)** na estrutura aberta (Adaptado de Di Russo et al., 2012).

Outras alterações do valor do pH podem ainda provocar um desdobramento das hélices para formar uma estrutura enrolada aleatoriamente ao mesmo tempo que, ocorre um decréscimo da rotação específica da proteína, alterando a sua estrutura secundária. A nível macroscópico, há formação de fibras amiloides e de agregação (Nelson & Cox, 2014; Talley & Alexov, 2010).

Na manipulação de proteínas deve-se ter em conta o valor do pH do meio pois, estudos demonstram que o pH da solução deve manter-se constante e igual ao pH ideal de estabilidade da proteína. É de facto importante pois está comprovado que o pH ideal de atividade têm uma forte correlação com o pH ideal de estabilidade, sendo essencial manter esse valor para que a proteína se apresente funcional (Talley & Alexov, 2010).

Desta forma, é importante numa atividade experimental monitorizar os valores de pH do meio para garantir que a adição de solventes ou a alteração da temperatura em nada afetam o pH do meio e consequentemente a atividade proteica.

Enzimas

As enzimas são proteínas com atividade catalítica específica que permitem que as reações químicas sejam realizadas com uma velocidade elevada e com alta especificidade, impedindo assim, a formação de subprodutos (Weil, 2000).

O que permite que as enzimas desempenhem as suas funções é a estrutura tridimensional que define o seu centro ativo. O centro ativo é o local de ligação aos substratos, ou seja, às moléculas ou ligandos que participam nas reações químicas (Rod R. Seeley, Trent D. Stephens, 2013).

A ligação dos substratos ao centro ativo faz com que a energia de ativação seja menor dado que, todos os intervenientes na reação estão mais próximos, e fazem com que a reação ocorra mais rapidamente pois os intervenientes estão orientados um para outro, facilitando as interações (Rod R. Seeley, Trent D. Stephens, 2013).

Há que lembrar ainda que o centro ativo não é uma estrutura fixa, podendo sofrer ligeiros ajustes para se adaptar melhor aos substratos que se vão ligar. No entanto, estes ajustes não podem ser confundidos com alterações conformacionais do centro ativo, pois estes podem impedir que o centro ativo mantenha as suas funcionalidades. As alterações podem ser provocadas por alterações de temperatura e pH, que vão resultar na quebra das pontes de hidrogénio (Rod R. Seeley, Trent D. Stephens, 2013).

Existem ainda enzimas que necessitam da ligação de cofactores para serem funcionais. Os cofactores são ligandos não proteicos que se ligam ao centro ativo e definem a atividade ou inatividade de uma enzima e são necessários como reguladores da função enzimática. A decisão de ligação do cofactor depende das necessidades celulares, isto é, no caso de existir falta de produto de reação, o cofactor liga-se à enzima estimulando uma determinada reação química. No caso de existir muita quantidade de produto, o cofactor é desligado e a reação química não se realiza ou é realizada a uma velocidade muito reduzida (Victor W. Rodwell, David A. Bender, Kathleen M. Botham, Peter J. Kennelly, 2016).

As enzimas são ainda muito específicas, pois só um determinado substrato é ligado ao seu centro ativo e por isso compreende-se a existência de um número tão elevado de enzimas para regular todas as reações celulares (Rod R. Seeley, Trent D. Stephens, 2013).

Nas reações químicas, as enzimas, convertem um ou mais substratos num ou mais produtos de reação, dependendo da reação que catalisam. Podem assim ser classificadas em seis classes:

As **oxidoredutases** catalisam oxidações e reduções; as **transferases** catalisam a transferência de moléculas com grupos glicosil, metil ou fosforil; as **hidrolases** realizam a clivagem de ligações entre dois átomos de carbono, um átomo de carbono e um átomo de oxigénio e outras ligações covalentes; as **liases** catalisam a clivagem das mesmas ligações que as hidrolases mas neste caso geram duplas ligações após a clivagem; as **ligases** catalisam a ligação de duas moléculas em reações com hidrólise de adeninatrifosfato-ATP; e por último as **isomerases** que catalizam reações de rearranjo estrutural e geométrico entre isómeros (Martinez Cuesta, Furnham, Rahman, Sillitoe, & Thornton, 2014, Victor W. Rodwell, David A. Bender, Kathleen M. Botham, Peter J. Kennelly, 2016).

Dado que as enzimas são dotadas de características funcionais benéficas - efetividade e especificidade - para além das suas funções inatas, atualmente estas também são utilizadas para o auxílio na biossíntese de fármacos complexos e antibióticos, para coadjuvarem no diagnóstico de doenças, nomeadamente, doenças cardíacas, genéticas e infecciosas, e ainda como proteínas modelos em ensaios de estabilidade, como é o caso da lisozima. (Victor W. Rodwell, David A. Bender, Kathleen M. Botham, Peter J. Kennelly, 2016, Noritomi et al., 2011).

Lisozima

A lisozima é uma enzima globular com uma única cadeia polipeptídica com 129 aminoácidos e um tamanho aproximado de 14,4 kDa. O primeiro aminoácido da cadeia da lisozima é lisina na extremidade -N e o último aminoácido da sua cadeia é a leucina na extremidade -C (Adriano Cruz, Patrícia Sá, Carlos Oliveira, 2017; Cegielska-Radziejewska, Leśnierowski, & Kijowski, 2008).

A sua forma tridimensional deriva de seis regiões em hélice e de quatro pontes de dissulfureto (S-S) (Cegielska-Radziejewska et al., 2008).

Na natureza a lisozima está presente na forma de monómero na maioria dos fluídos do corpo humano, principalmente na saliva e no fluido ocular. No entanto, a sua

extração é feita do ovo de galinha onde esta se encontra facilmente disponível e em maiores concentrações (Cegielska-Radziejewska et al., 2008).

O pH ótimo desta enzima é a 6,2 ainda que esteja ativa num intervalo entre 6 e 9 (Egorova et al., 2017; “Lysozyme from chicken egg white for Molecular Biology,” 2013).

A enzima no ser humano tem capacidade bacteriostática e bacteriolítica, principalmente na proteção contra bactérias Gram-positivas, como é o caso da sua ação lítica contra o *Micrococcus lysodeikticus* (Adriano Cruz, Patrícia Sá, Carlos Oliveira, 2017). O seu mecanismo reacional realiza-se através da hidrólise do peptidoglicano, composto presente na parede celular das bactérias Gram-positivas (Cegielska-Radziejewska et al., 2008). No entanto, já existem estudos que demonstram a ação da lisozima em bactérias Gram-negativas, contudo nestes casos a enzima tem que sofrer algumas alterações estruturais induzidas (Cegielska-Radziejewska et al., 2008).

Para além da sua atividade antibacteriana, a lisozima na forma de dímero também apresenta atividade imunoestimuladora e imunomoduladora pois induz a atividade fagocitária, influenciando processos imunológicos e síntese de imunoglobulinas (Cegielska-Radziejewska et al., 2008).

Esta proteína é utilizada ainda como coadjuvante na formulação de antibióticos e analgésicos para infeções virais e bacterianas, no tratamento de leucemia e de doenças neoplásicas (Cegielska-Radziejewska et al., 2008; Noritomi et al., 2011)

Para além das aplicações acima descritas, a lisozima é uma enzima largamente utilizado como modelo proteico em estudos científicos. Não só pelas suas propriedades, estrutura, função, e termoestabilidade estarem descritas de forma extensa na literatura mas também por ter pequenas dimensões, boa estabilidade, facilidade em cristalizar e ainda pela sua resistência às mudanças conformacionais. Todas estas características são vantajosas para os estudos estruturais e funcionais de proteínas. (Bijelic et al., 2014; Noritomi, Minamisawa, Kamiya, & Kato, 2011; Schröder, 2017)

Apesar de se registar um aumento de estudos publicados com proteínas, há um longo caminho a percorrer para que possamos usufruir das suas propriedades valiosas como ativos farmacológicos, sem que os processos de formulação destabilizem a sua estrutura.

No que diz respeito à estabilização de proteínas, têm surgido nas últimas décadas, diversos estudos sobre alternativas para este efeito, como mutações na própria molécula, alterações conformacionais induzidas por suportes físicos, e ainda a utilização de solventes e co-solventes estabilizadores, como é o caso da utilização de líquidos iônicos (Chen, Liu, & Wang, 2010; Weingärtner, Cabrele, & Herrmann, 2012).

Líquidos Iônicos

Entre o ano de 2002 e 2009, o número de estudos sobre a aplicação de líquidos iônicos, LI, em ensaios com proteínas aumentou consideravelmente, **Figura 3** (Chen et al., 2010) sendo que mais de 50% desses estudos se referem à ação destes solventes na estabilidade e atividade (Chen et al., 2010; Weingärtner et al., 2012). Este interesse pela aplicação de líquidos iônicos em estudos com proteínas, tem continuado até à atualidade (Schröder, 2017).

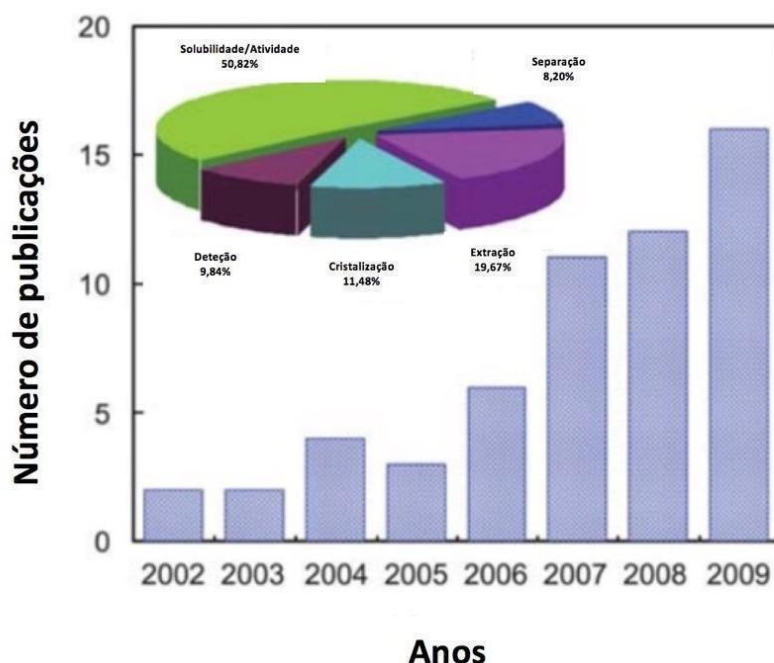


Figura 3 – Número de publicações de ensaio de proteína, em diversas fases, com a aplicação de líquidos iônicos desde o ano de 2002 até ao ano de 2009 (adaptado de Chen et al., 2010).

O elevado número de publicações revela a importância destes estudos e mostram não só a eficácia dos LI como solventes, auxiliando o aumento da solubilidade das proteínas, mas também revelam a sua capacidade de solvatação e a sua capacidade de evitar a agregação quando a proteína é exposta a agentes externos, como no caso de elevadas temperaturas (Chen et al., 2010; Weingärtner et al., 2012).

Os líquidos iônicos são sais constituídos por iões, um catião orgânico e um anião que pode ser de origem orgânica ou inorgânica. Apresentam um ponto de fusão abaixo dos 100 °C e alguns deles são líquidos à temperatura ambiente (Chen et al., 2010; Egorova et al., 2017; Gouveia et al., 2014; Santos de Almeida et al., 2017). Dado que estes compostos são providos de carga, apresentam-se com baixas pressões de vapor e não são voláteis. Estes líquidos possuem alguma viscosidade e, possuem uma grande diversidade de propriedades físico-químicas, como a sua capacidade de dissolver substâncias orgânicas e inorgânicas (Egorova et al., 2017; Gouveia et al., 2014). Adicionalmente, estes líquidos são definidos como *designer solvents* devido às suas propriedades físico-químicas ajustáveis, ou seja, características como a viscosidade, hidrofobicidade, polaridade e a miscibilidade, entre outras, podem ser controladas pela seleção dos seus constituintes iónicos, a fim de direcionar as suas características de acordo com as necessidades (Chen et al., 2010). Por fim, alguns líquidos iónicos têm sido descritos como compostos químicos verdes, com uma toxicidade bastante reduzida, quando comparados com os solventes químicos tradicionais (Egorova et al., 2017; Santos de Almeida et al., 2017).

Os líquidos iónicos têm inúmeras aplicações na área farmacêutica, nomeadamente, na síntese de fármacos onde agem como mediadores de reações químicas, como catalisadores reacionais e ainda como aditivos para a catálise enzimática. Adicionalmente, como veículos podem surgir como solventes, co-solventes, co-polímeros e emulsionantes e nos sistemas de veiculação têm um papel de agentes de dispersão, catalisadores e mediadores da permeação - **Figura 4**. Por fim estes sais são também utilizados em sistemas de análise, como análise UV, análise IV, eletroforese, cromatografia, extração, entre outras (Egorova et al., 2017).

Atualmente encontram-se em estudo diversos sistemas contendo líquidos iónicos, nomeadamente, sistemas LI-proteínas, sistema LI-lípidos, sistemas LI-água, entre muitos outros. Nestes sistemas é necessário estudar as propriedades desses

líquidos, bem como as suas estruturas, a sua atividade biológica e a sua toxicidade em conjunto com o ativo associado (Egorova et al., 2017). Estes líquidos iônicos poderão ter um papel fundamental nos diversos passos da produção de um ativo farmacêutico (Egorova et al., 2017).

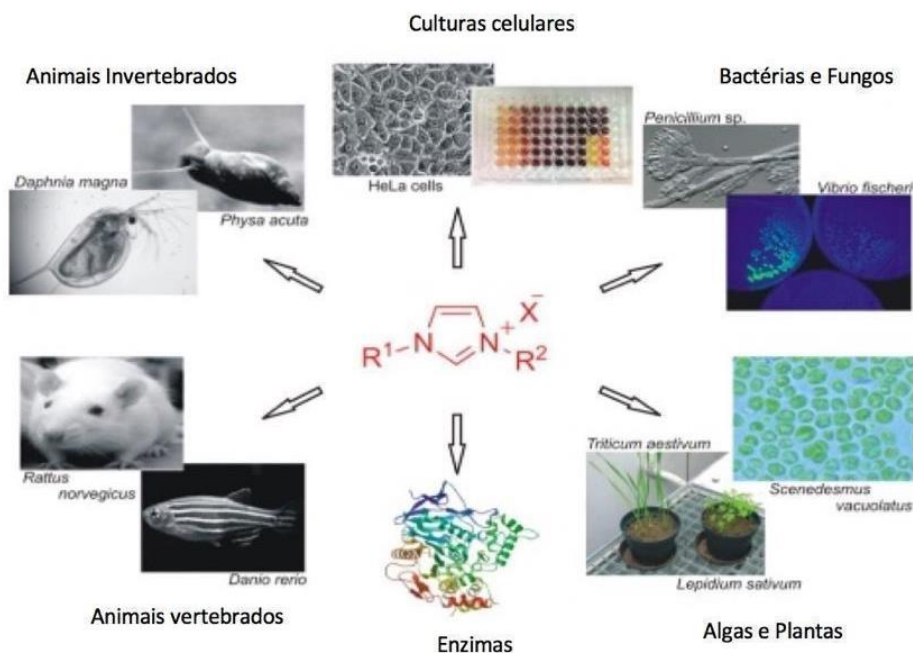


Figura 4 – Aplicabilidades dos líquidos iônicos em diversas vertentes (adaptado de Santos de Almeida et al., 2017).

Classificação dos Líquidos Iônicos

Os líquidos iônicos podem ser classificados em três gerações distintas diferindo entre elas a estrutura química e as propriedades dos líquidos (Ana P.M. Tavares, 2013; Egorova et al., 2017).

A **primeira geração de líquidos iônicos** são compostos por catiões dialquiloimidazólicos ou alquil-piridínios e aniões como os halogenetos. Esta geração caracteriza-se pela sua toxicidade e reatividade na presença de água que não lhes permite participar em determinadas reações químicas a nível biológico. (Ana P.M. Tavares, 2013; Egorova et al., 2017).

A **segunda geração de líquidos iónicos**, mantém os catiões mais comuns, dialquiloimidazólico, alquil-piridínios e adiciona os catiões de amónio e fósforo. Os aniões mais comuns nesta geração são halogénios, o tetrafluoroborato e o hexafluorofosfato, **Figura 5**. Esta geração já contém líquidos estáveis em soluções aquosas, estáveis numa atmosfera com oxigénio, diferentes valores de viscosidade, entre outras características que fizeram desta geração a mais estudada e com maior número de aplicações, nomeadamente na atividade, estabilidade e cinética enzimática (Ana P.M. Tavares, 2013; Egorova et al., 2017).

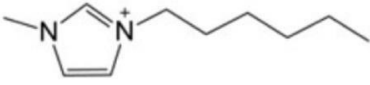
Líquidos iónicos derivados de Imidazol	
Catão	 [C6mim]
Anião	Br⁻

Figura 5 – Exemplo de um catão e de um anião que compõem um líquido iónico da segunda geração (Adaptado de Santos de Almeida et al., 2017).

A **terceira geração de líquidos iónicos** baseia-se em aniões com propriedades mais hidrófobas e estáveis como alguns açúcares, alquilosulfatos e ainda compostos com capacidade biodegradável como é o caso da colina e dos aminoácidos, **Figura 6**, sendo que esta geração para além das propriedades físicas e químicas intrínsecas aos líquidos iónicos acrescentam as propriedades biológicas e ecológicas (Ana P.M. Tavares, 2013; Egorova et al., 2017). Dentro das vantagens da utilização destes LI estão os custos reduzidos e a baixa toxicidade quando comparados aos da segunda geração (Ana P.M. Tavares, 2013; Egorova et al., 2017).

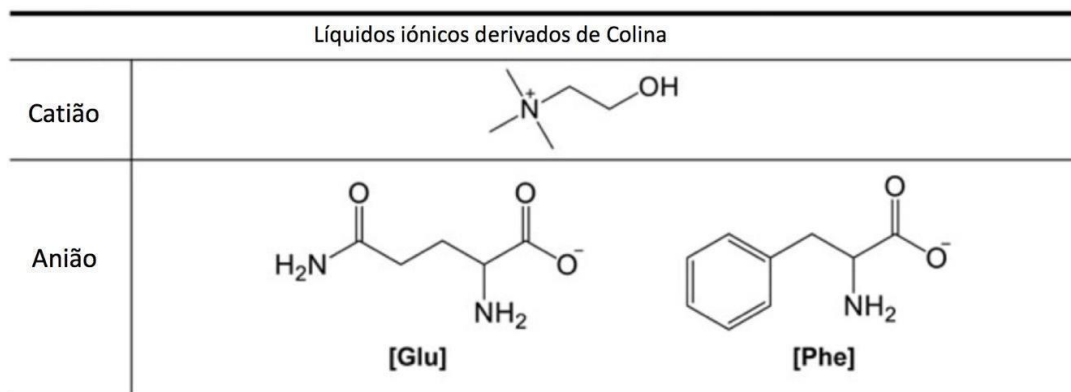


Figura 6 – Exemplo de um catião e de vários aniões que compõem os líquidos iônicos da terceira geração (Adaptado de Santos de Almeida et al., 2017).

Aplicabilidade dos Líquidos Iônicos como Ingredientes Funcionais

Uma das limitações encontradas na utilização de compostos farmacologicamente ativos diz respeito à sua baixa solubilidade em água (Ana P.M. Tavares, 2013; Egorova et al., 2017). Neste âmbito, os LI têm sido referidos como potenciais ingredientes funcionais no que diz respeito ao aumento da solubilidade e da incorporação desses ativos em sistemas de veiculação (Ana P.M. Tavares, 2013; Egorova et al., 2017). No caso específico da Indústria Farmacêutica, um LI para ser considerado solvente têm ainda que ter a capacidade de solubilizar mais do que 1 mg/mL (Ana P.M. Tavares, 2013; Egorova et al., 2017). Assim, alguns estudos demonstraram a capacidade dos líquidos iônicos aumentarem a solubilidade de ativos hidrofílicos e hidrofóbicos, pela sua adaptação a diversos meios, nomeadamente a soluções aquosas, oleosas e hidroalcoólicas (Santos de Almeida et al., 2017).

No que diz respeito à solubilidade, a maioria dos líquidos iônicos estudados são os clássicos derivados do catião de imidazol, pois estes foram os primeiros a serem propostos e são os mais estudados quanto às suas propriedades termofísicas, hidrofobicidade e polaridade (Ana P.M. Tavares, 2013). Estudos recentes indicam que estes LI de segunda geração, nomeadamente o LI [C6mim][Br], utilizado neste trabalho, apresentam um poder surfactante superior quando comparado com outros LI, devendo-se esta propriedade ao tamanho cadeia de alquilo do catião e apresentando, consequentemente, boa permeabilidade para com as membranas celulares (Santos de Almeida et al., 2017).

No entanto, os LI derivados de imidazol também têm sido descritos como sendo dos mais tóxicos, pelo que considerar a sua toxicidade aquando da sua aplicação é fundamental. Adicionalmente, uma vez que LI derivados de aminácidos e colina têm sido descritos como menos tóxicos e têm demonstrado bons resultados como potenciadores da solubilidade tanto em ativos hidrofílicos como em ativos hidrofóbicos (Santos de Almeida et al., 2017), o interesse nesta classe tem aumentado nos últimos tempos.

Assim, no que diz respeito à aplicabilidade dos LI em sistemas biológicos, esta tem sido feita com alguma precaução devido à potencial toxicidade de alguns destes sais. De acordo com os estudos realizados, a potencial toxicidade pode depender do comprimento da cadeia lateral de alquila do catião, da presença e da natureza dos grupos funcionais do catião, da natureza catiónica e aniónica e ainda das interações entre anião e catião (Egorova et al., 2017). Assim, sempre que se pretenda a aplicação destes líquidos iónicos, principalmente na área da saúde, é fundamental avaliar a sua citotoxicidade e considerar esses resultados aquando da sua utilização. Por exemplo, no caso dos líquidos iónicos derivados de imidazol, encontra-se descrito que, no caso do LI [C6mim][Br], a concentração deste sal em que é mantida viabilidade celular é de 0,01% (v/v). Por sua vez, os LI derivados da colina, nomeadamente o [Cho][Phe] e o [Cho][Glu], permitem a manutenção da viabilidade celular a concentrações 20 vezes superiores (0,2%) (Santos de Almeida et al., 2017).

Assim, estes estudos podem conduzir à aplicabilidade destes solventes em sistemas biológicos, desde que os referidos LI sejam aplicados em concentrações onde a viabilidade celular é mantida.

Neste âmbito, o presente estudo pretende avaliar o potencial dos três LI referidos anteriormente, [C6mim][Br], [Cho][Phe] e [Cho][Glu], como estabilizadores térmicos de proteínas, utilizados nas suas concentrações não citotóxicas (Santos de Almeida et al., 2017).

O trabalho experimental contempla duas partes, a primeira destina-se à validação do método experimental e a segunda parte dedica-se aos ensaios de estabilidade onde foram testados os três líquidos iónicos em solução contendo como proteína modelo, a lisozima. Assim, pretende-se com este estudo compreender o impacto destes sais na estabilização térmica da lisozima e classificá-los como potenciais estabilizadores de outras proteínas com atividade farmacológica.

Capítulo I: Materiais e Métodos

1.1 Materiais

Aagitador magnético

Balança analítica - Sortorius®

Bico de Bunsen

Espetrofotômetro UV microplacas - Thermo scientific – Multiskan FC®

Estufa

Frigorífico

Incubadora com aquecimento e agitação - Metrohm 827 pH labor®

Material corrente de laboratório

Potenciômetro

Micropipeta P20, P100, P200, P1000, P5000

Micropipeta multicanal P200

Microplacas de 96 poços

Placa de aquecimento

Vortex - Stuart®

1.2 Reagentes

1-Hexil-3-metilimidazolio [C6mim][Br]

(2-Hidroxietil)-trimetilamônio-L-fenilalaninato, [Cho][Phe]

(2-Hidroxietil)-trimetilamônio-L-glutamato, [Cho][Glu]

Água bidestilada

Bactéria *Proteus luteus*

Lisozima (Sigma-Aldrich)

Reagentes do Kit BCA (Solução BCA e Solução de cobre - Sigma-Aldrich)

Tampão fosfato pH 7,4 (NaCl, NaH₂PO₄.2H₂O, Na₂HPO₄.2H₂O – USP 32)

1.3 Métodos

1.3.1 Validação do Método Analítico

Para efetuar a validação do método foram preparadas duas curvas de calibração para a lisozima, uma em água bidestilada e outra em tampão fosfato pH 7,4.

Para a construção das curvas de calibração da proteína foram preparadas soluções-mãe a uma concentração de 2 mg/mL e estas utilizadas para preparar as soluções padrão. As concentrações das soluções padrão variaram entre 100 µg/mL e de 500 µg/mL.

As curvas de calibração obtidas, foram posteriormente utilizadas para a restante validação do método analítico bem como para os ensaios de estabilidade.

Ainda para a validação do método analítico foram estudados três parâmetros:

Exatidão: Procedimento analítico que pode ser definido pela concordância entre a média de uma série de resultados e um valor de referência teórico para um analito.

Precisão: Exprime a conformidade entre uma série de medições obtidas por determinações múltiplas de uma mesma amostra homogénea, em condições determinadas.

Repetibilidade: Exprime a precisão nas mesmas condições experimentais, isto é, um método analítico executado por um mesmo analista, utilizando o mesmo equipamento, num período curto de tempo.

Desta forma para a validação do método foram preparadas duas soluções de lisozima em água bidestilada - solução A e a solução B – e duas soluções de lisozima em tampão fosfato pH 7,4 - solução C e a solução D.

A concentração das soluções A e C foi de 250 µg/mL e a concentração das soluções B e D foi de 400 µg/mL,

Para a determinação da **exatidão**, as soluções A, B, C e D foram medidas, para avaliar se as suas concentrações determinadas a partir da curva de calibração correspondiam às respetivas concentrações teóricas.

Para avaliar a **precisão** três amostras das soluções B e D foram individualmente medidas, nas mesmas condições, para confirmar se as três medições teriam o mesmo valor de concentração.

Finalmente para avaliar a **repetibilidade** foram medidas nove vezes a mesma amostra B e D, para se comprovar nas mesmas condições experimentais, que os valores das concentrações são iguais.

1.3.2 Ensaio de Estabilidade

1.3.2.1 Preparação de soluções

Foram preparadas quatro soluções de lisozima E, F, G e H, em água bidestilada e em diferentes líquidos iónicos, **Tabela 1**. Seguidamente procedeu-se a uma agitação manual durante 5 segundos de modo a homogeneizar as soluções preparadas.

Tabela 1. Soluções de lisozima E, F, G e H em água bidestilada e LI, utilizadas no ensaio de estabilidade térmica 1 e 2.

Solução	[Lisozima] (µg/mL)	Solventes (mL)
E	2	H ₂ O bidestilada:[Cho][Phe] (99,8:0,2)
F	2	H ₂ O bidestilada:[Cho][Glu] (99,8:0,2)
G	2	H ₂ O bidestilada:[Cho][Glu] (99,8:0,2)
H	2	H ₂ O bidestilada:[C6mim][Br] (99,99:0,01)

Foram ainda preparadas duas soluções I e J de lisozima em tampão fosfato pH 7,4 e em diferentes líquidos iónicos, **Tabela 2**. Procedeu-se como anteriormente a uma agitação manual durante 5 segundos de forma a homogeneizar as soluções preparadas.

Tabela 2. Soluções de lisozima I e J em tampão fosfato pH 7,4 e LI, utilizadas no ensaio de estabilidade térmica 3.

Solução	[Lisozima] (µg/mL)	Solventes (mL)
I	2	Tampão fosfato pH 7,4:[Cho][Phe] (99,8:0,2)
J	2	Tampão fosfato pH 7,4:[Cho][Glu] (99,8:0,2)

Para além das soluções em estudo, foram ainda preparadas para cada um dos ensaios, uma solução controlo constituída por lisozima e solvente e soluções utilizadas como branco, **Tabela 3.**

Tabela 3. Soluções controlo e soluções branco utilizadas nos ensaios de estabilidade térmica 1, 2 e 3.

Solução	[Lisozima] (µg/mL)	Solventes (mL)
Controlo ₁	2	H ₂ O bidestilada
Controlo ₂	2	Tampão fosfato pH 7,4
Branco ₁	0	H ₂ O bidestilada
Branco ₂	0	H ₂ O bidestilada:[Cho][Phe] (99,8:0,2)
Branco ₃	0	H ₂ O bidestilada:[Cho][Glu] (99,8:0,2)
Branco ₄	0	H ₂ O bidestilada:[C6mim][Br] (99,99:0,01)
Branco ₅	0	Tampão fosfato pH 7,4
Branco ₆	0	Tampão fosfato pH 7,4:[Cho][Phe] (99,8:0,2)
Branco ₇	0	Tampão fosfato pH 7,4:[Cho][Glu] (99,8:0,2)

1.3.2.2 Estabilidade térmica

A estabilidade térmica foi estudada através da medição da atividade enzimática da lisozima em três ensaios diferentes, onde variou a temperatura bem como a duração do ensaio, **Tabela 4.**

Tabela 4. Dados de temperatura, duração, solvente e soluções estudadas em cada um dos ensaios de estabilidade térmica 1, 2 e 3.

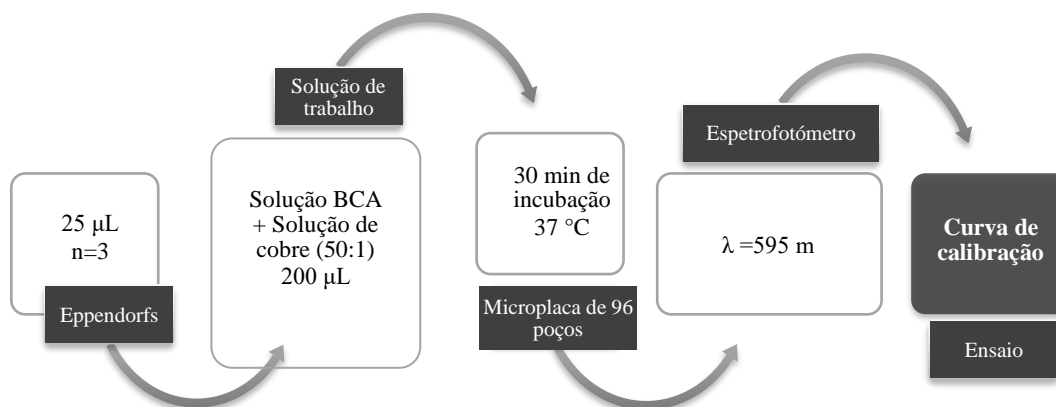
Ensaio	Temperatura (°C)	Duração (h)	Soluções Estudadas
1	60	24	E, F, controlo ₁ e brancos _{1,2,3}
2	90	4	G, H, controlo ₁ e brancos _{1,3,4}
3	90	1,5	I, J, controlo ₂ e brancos _{6,7}

Para os ensaios de estabilidade 1, 2 e 3 foram preparadas soluções em triplicado, e posteriormente colocadas na incubadora com aquecimento e agitação no caso da exposição a 60 °C, e num banho de parafina no caso da exposição a 90 °C. Em todos os ensaios, a temperatura foi monitorizada e a agitação foi mantida a 200 rpm.

1.3.2.3 Doseamento proteico

Para o doseamento proteico foi usado o ensaio do Bicinchoninic acid – BCA - em microplacas.

Pipetou-se 25 µL da amostra de cada *vial* para uma microplaca e adicionou-se 200 µL de uma solução trabalho (solução de BCA + solução de cobre 50:1). A microplaca foi de seguida levada a incubar a 37 °C durante 30 minutos e de seguida foi efetuada a leitura das absorvâncias a 595 nm, após arrefecimento da placa à temperatura ambiente, utilizando o espectrofotómetro UV microplacas, **Figura 7**. As absorvâncias obtidas permitiram determinar as concentrações de proteína nas amostras estudadas, utilizando a curva de calibração, previamente determinada. Todas as amostras foram realizadas em triplicado.

**Figura 7** – Esquema do procedimento do ensaio do doseamento proteico.

1.3.2.4 Atividade biológica do sistema

A atividade biológica da lisozima foi medida através de um ensaio turbidimétrico modificado.

Assim, foram adicionados a 225 µL de uma suspensão de *Proteus luteus* em água bidestilada ou em tampão fosfato pH 7,4, a 25 °C, a 25 µL de cada *vial* dos ensaios de estabilidades e mediram-se as absorvâncias a 450 nm durante 4,5 minutos, de 30 em 30 segundos, utilizando o espectrofotómetro UV microplacas. O declive da linha de tendência obtida é depois usado para quantificar a atividade enzimática da lisozima através da seguinte equação, **Figura 8**:

$$\frac{\text{Unidades}}{\text{mg}} = \frac{\Delta \frac{A_{450}}{\text{minuto}} \times 1000}{\text{mg de enzima na mistura de reação}}$$

Figura 8 – Equação que determina o valor da atividade enzimática da lisozima.

1.3.2.5 Determinação do pH

Para todas as soluções efetuou-se ainda a medição do pH, antes e após a exposição às diferentes temperaturas.

Capítulo II: Resultados e Discussão

2.1 Validação do Método Analítico

A validação do método iniciou-se pela realização de duas curvas de calibração. A curva de calibração em água bidestilada apresentou uma equação da reta $y = 0,001x + 0,0506$ com um $R^2 = 0,999$ e a curva de calibração em tampão fosfato pH 7,4 apresentou uma equação da reta $y = 0,001x + 0,0618$ com um $R^2 = 0,997$. Perante estes resultados podemos afirmar que o método é linear.

De seguida realizou-se o estudo dos parâmetros de exatidão, precisão e repetibilidade para as soluções em água bidestilada e para as soluções em tampão fosfato pH 7,4.

Assim, considera-se que um método é exato quando média da taxa de recuperação é de $[100\% \pm 2\%]$. Deste modo perante os resultados da **Tabela 5** considera-se este método exato.

Tabela 5. Valores da média da taxa de recuperação para cada uma das soluções as soluções A, B, C e D, utilizadas para aferir o método da exatidão.

Solução	Média da taxa de recuperação (%)
A	99,36%
B	99,60%
C	99,64%
D	99,60%

No que respeita à precisão, o método é considerado preciso se o desvio padrão relativo – DPR - da taxa de recuperação for inferior a 1%. Com os resultados apresentado na **Tabela 6**, este método considera-se preciso.

Tabela 6. Valores da média da taxa de recuperação e DPR para as soluções B e D que foram obtidos para a análise do parâmetro precisão.

Solução	Média da taxa de recuperação	DPR (%)
B	99,60	0,27
B	100,03	
B	100,10	
D	99,77	0,12
D	100,02	
D	99,87	

Por último, a repetibilidade de um método analítico é considerada quando o DPR da taxa de recuperação para todas as leituras é inferior a 1%.

Após os cálculos a solução B apresenta um DPR de 0,003 e a solução D um DPR de 0,002, pelo que se conclui que há repetibilidade do método analítico, **Tabela 7**.

Tabela 7. Valores da média da taxa de recuperação e DPR para as soluções B e D que foram obtidos para a análise do parâmetro de repetibilidade.

Solução	Média da taxa de recuperação (%)	DPR (%)
B1	99,60	0,003
B2	99,55	
B3	99,67	
B4	100,30	
B5	100,32	
B6	100,22	
B7	100,10	
B8	100,05	
B9	100,02	
D1	99,77	0,002
D2	99,92	
D3	99,87	
D4	100,27	
D5	100,30	
D6	100,27	
D7	99,87	
D8	99,90	
D9	99,85	

2.2. Ensaio de estabilidade

Os ensaios de estabilidade da lisozima são baseados na manutenção da sua atividade enzimática lítica. No caso de a enzima estar ativa, atua por lise da bactéria *Proteus Luteus*, que em suspensão se torna menos turva. Graficamente este efeito é representado por uma reta decrescente devido à diminuição dos valores de densidade ótica das soluções.

No caso de a enzima ter perdido a estabilidade, a sua atividade fica comprometida, verificando-se uma suspensão com a mesma turvação que apresentava inicialmente, pois a lisozima perde a capacidade de lise das bactérias da solução. Graficamente observa-se uma reta sem decréscimo, porque não existiram alterações nos valores de densidade ótica das soluções.

Para além de graficamente se poder observar a manutenção da atividade da enzima, pode calcular-se a atividade enzimática da lisozima com base na equação, **Figura 8**, que relaciona o declive do gráfico de cinética enzimática e a massa de enzima, resultando num valor de atividade específica.

Assim, é possível comparar os valores de atividade enzimática resultante das equações antes e depois da exposição à temperatura. No caso desses valores se apresentarem constantes, significa que a atividade é mantida. No caso do valor de atividade enzimática dado pela equação após a exposição à temperatura, se apresentar inferior ao valor inicial, significa que houve perda de atividade enzimática resultante de possíveis alterações na estabilidade da lisozima.

2.2.1 Ensaio de estabilidade prolongada – Ensaio 1

No ensaio 1 foram analisadas as soluções E e F ambas em água bidestilada, contendo respetivamente os líquidos iónicos [Cho][Phe] e [Cho][Glu].

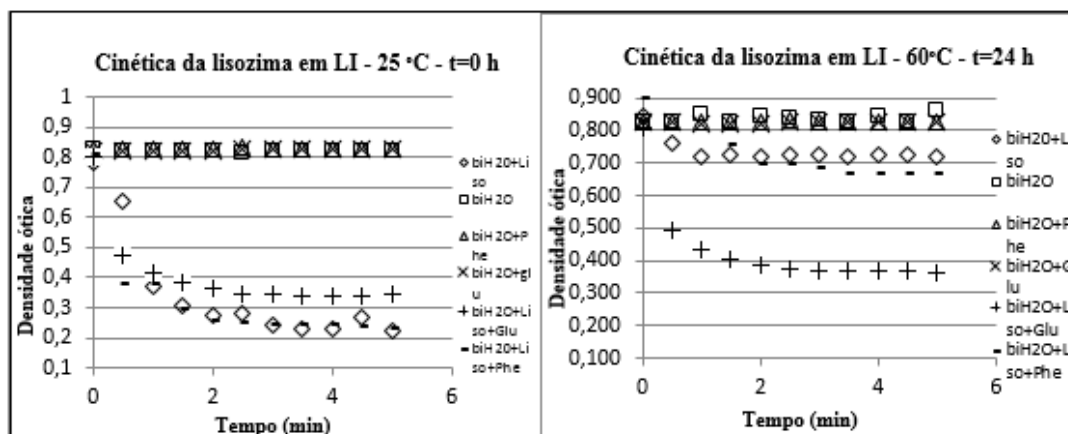


Figura 9 - Gráficos representativos da cinética enzimática, a) $t=0$ h com e sem adição de líquidos iónicos e a 25 °C; b) $t=24$ h com e sem adição de líquidos iónicos e a 60 °C.

Para além dos gráficos da cinética enzimática **Figura 9**, foram calculadas as atividades enzimáticas específicas para as soluções E e F e ainda para a solução controlo – sem LI – antes e após a exposição à temperatura de 60 °C, **Tabela 8**.

Tabela 8. Valores de atividade antes e após exposição à temperatura de 60 °C e valores da taxa de recuperação enzimática, das soluções do ensaio de estabilidade 1.

Solução	Atividade T_{amb} (U/mL)	Atividade $T_{60\text{ °C}}$ (U/mL)	Atividade recuperada (%)
Controlo (Lisozima + biH ₂ O)	405,85	121,76	30,00
E (Lisozima + LI [Cho][Phe] + biH ₂ O)	420,26	182,20	43,35
F (Lisozima + LI [Cho][Glu] + biH ₂ O)	376,86	249,02	66,08

Perante a **Figura 9** e como seria de esperar, as soluções que não contém lisozima, não apresentam atividade enzimática.

No que respeita à **Tabela 8**, pode verificar-se que para todas as soluções após exposição à temperatura – 60 °C - há um decréscimo da atividade da lisozima. No entanto, a solução na presença do LI [Cho][Glu] apresenta uma percentagem de atividade recuperada – 66,08% – superior ao valor das restantes soluções do mesmo

ensaio. Estes resultados indicam o LI [Cho][Glu] parece ser o que têm melhor capacidade como estabilizador da lisozima.

Relativamente ao LI [Cho][Phe], apesar da taxa de recuperação não ser inferior à solução sem adição de co-solvente, o valor é relativamente baixo, podendo indicar que nestas condições, este LI não apresenta uma vantagem tão elevada como o co-solvente [Cho][Glu] na estabilização da proteína.

2.2.2 Ensaio de estabilidade acelerada – Ensaio 2

No ensaio 2 foram analisadas as soluções G e H ambas em água bidestilada, contendo respetivamente os líquidos iónicos [Cho][Glu] e [C6mim][Br].

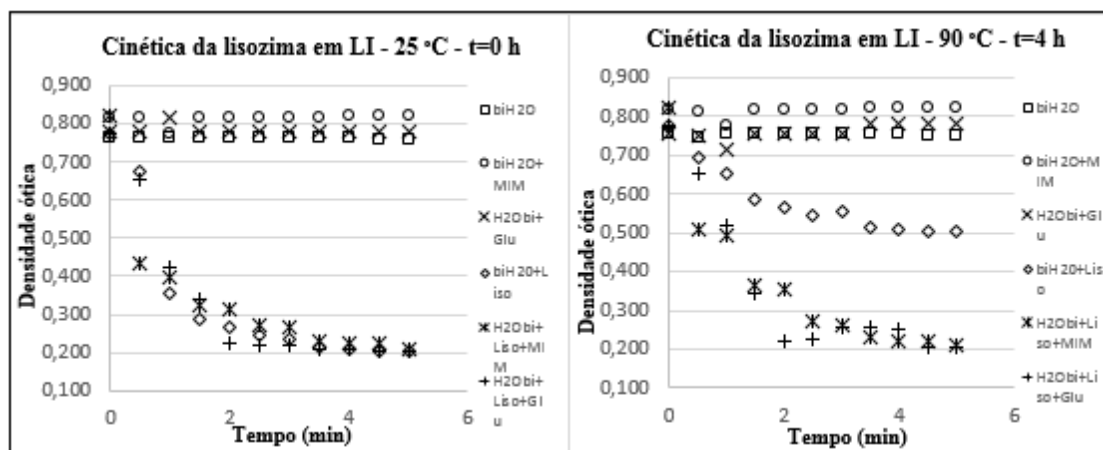


Gráfico a)

Gráfico b)

Figura 10 – Gráficos representativos da cinética enzimática, a) t= 0 h com e sem adição de líquidos iónicos e a 25 °C; b) t= 4 h com e sem adição de líquidos iónicos e a 90 °C.

Para além dos gráficos da cinética enzimática **Figura 10**, à semelhança do ensaio 1, foram calculadas as atividades enzimáticas específicas para as soluções G e H e ainda para a solução controlo – sem LI – antes e após a exposição à temperatura de 90 °C, **Tabela 9**.

Tabela 9. Valores de atividade antes e após exposição à temperatura de 90 °C e valores da taxa de recuperação enzimática, das soluções do ensaio de estabilidade 2.

Solução	Atividade T_{amb} (U/mL)	Atividade T₉₀ °C (U/mL)	Atividade recuperada (%)
Controlo (Lisozima + biH₂O)	437,01	124,12	28,40
G (Lisozima + LI [Cho][Glu] + biH₂O)	315,14	262,62	83,33
H (Lisozima + LI [C6mim][Br] + biH₂O)	366,43	334,42	91,26

No ensaio 2 as condições experimentais, temperatura e duração do ensaio, foram alteradas. Quanto à temperatura, esta foi alterada de 60 °C para 90 °C com o objetivo de observar os efeitos da atividade enzimática em condições de *stress* máximo. Por outro lado, relativamente à duração do ensaio este foi encurtado para 4 horas, tendo em conta que a formulação e manipulação proteica ao nível da Indústria Farmacêutica, não será igual ou superior a 24 horas.

Para além disto, tendo em conta que no ensaio de estabilidade 1, o LI [Cho][Phe] não apresentou resultados tão positivos, quando comparado com o LI [Cho][Glu], utilizou-se o LI [C6mim][Br] no ensaio 2. Optou-se por este LI derivado de imidazol, [C6mim][Br], por apresentar propriedades físico-químicas que se consideram mais vantajosas para a estabilidade, nomeadamente o pH mais baixo do que os derivadas da colina e o tamanho da sua cadeia de alquila que poderá ser benéfico na estabilidade da enzima (Caparica, 2017).

Desta forma, os líquidos iónicos utilizados neste ensaio foram o LI [Cho][Glu] e [C6mim][Br], que após exposição à temperatura exprimiram valores de atividade recuperada muito superiores aos valores da solução sem LI, **Tabela 9**. A solução na presença de LI [Cho][Glu] apresentou uma taxa de recuperação de atividade de 83,33% e a solução na presença de LI [C6mim][Br] de 91,26%.

Há que notar que a concentração de LI [C6mim][Br] utilizada foi de 0,01% (v/v) de forma a garantir que estamos a trabalhar a uma concentração abaixo do valor de citotoxicidade descrito (Santos de Almeida et al., 2017). Mesmo assim, o LI mantém as suas propriedades estabilizadoras, demonstrando que este pode ter potencial como co-solvente estabilizador.

2.2.3 Ensaio de estabilidade acelerada – Ensaio 3

Por fim, no terceiro ensaio, foram colocadas as soluções I e J, ambas em tampão fosfato pH 7,4, contendo os líquidos iónicos [Cho][Phe] e [Cho][Glu, respetivamente. O ensaio foi realizado à temperatura de 90 °C durante 1,5 horas.

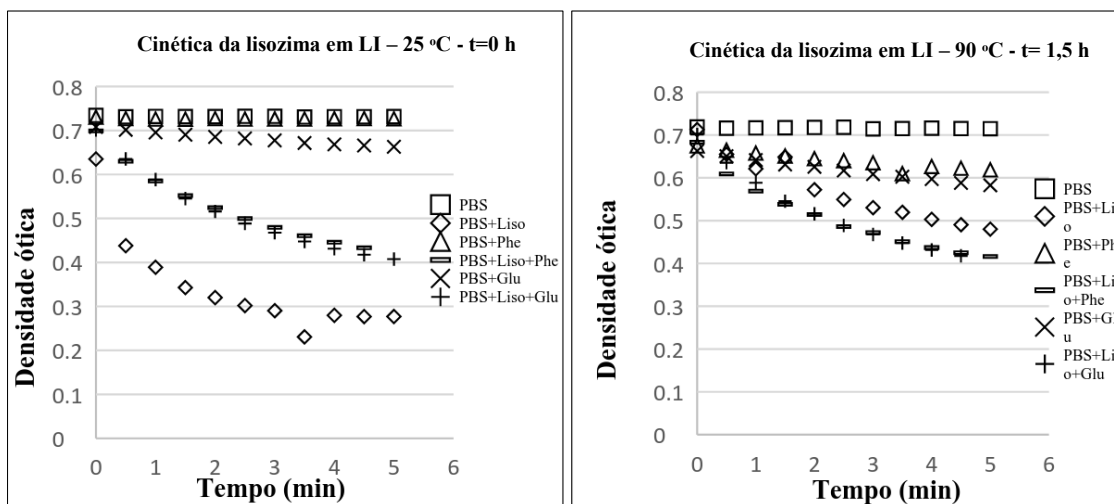


Gráfico a)

Gráfico b)

Figura 11 – Gráficos representativos da cinética enzimática, a) t= 0 h com e sem adição de líquidos iónicos e a 25 °C; b) t=1,5 h com e sem adição de líquidos iónicos e a 90 °C.

Os gráficos da cinética enzimática apresentam-se na **Figura 11**. Mais uma vez foi calculada a atividade enzimática específica da lisozima para as soluções I e J e ainda para a solução controlo – sem LI – antes e após a exposição à temperatura de 90 °C, **Tabela 10**.

Tabela 10. Valores de atividade antes e após exposição à temperatura de 90 °C e valores da taxa de recuperação enzimática, das soluções do ensaio de estabilidade 3.

Solução	Atividade T_{amb} (U/mL)	Atividade T₉₀ °C (U/mL)	Atividade recuperada (%)
Controlo (Lisozima + biH ₂ O)	225,95	124,12	37,27
I (Lisozima + LI [Cho][Phe] + biH ₂ O)	104,70	87,25	83,33
J (Lisozima + LI [Cho][Glu] + biH ₂ O)	103,78	102,78	99,04

Neste ensaio foi utilizado como solvente o tampão fosfato pH 7,4, em substituição da água bidestilada, utilizada nos ensaios anteriores. A alteração de solvente teve como objetivo, diminuir as variações de pH do meio e assim compreender se estas variações podem ter influência na atividade da lisozima.

Tabela 11. Determinações do valor de pH para as soluções controlo, com o LI [Cho][Phe] e com o LI [Cho][Glu] em água bidestilada e em tampão fosfato pH 7,4.

Solução	pH em biH₂O	pH em tampão fosfato pH 7,4
Controlo (Lisozima + Solvente)	6,14	7,72
Lisozima + [Cho][Phe] + Solvente	9,77	7,57
Lisozima + [Cho][Glu] + Solvente	7,65	7,54

Neste estudo, as taxas de recuperação de atividade na presença dos LI [Cho][Phe] e LI [Cho][Glu] foram elevadas, sendo que, para o primeiro o valor foi de 83,33% e para o segundo foi de 99,04%. Estas taxas de recuperação de atividade representam resultados promissores, uma vez que são superiores à taxa de recuperação de atividade calculada para a solução na ausência de LI – 37,27%.

Adicionalmente, pode ainda concluir-se, que o LI [Cho][Glu], apresenta qualidades estabilizadoras nos três ensaios realizados.

Mais ainda, o ensaio revelou qualidades estabilizadores do LI [Cho][Phe] que não foram observadas no ensaio 1. Este resultado pode estar relacionado com menor

variabilidade do pH do meio, resultante da alteração do solvente para uma solução tamponada.

O pH da solução com o LI [Cho][Phe] em água bidestilada é influenciado pela basicidade deste líquido iónico, **Tabela 11**, o que faz com esta solução não esteja dentro dos valores de pH onde há manutenção da atividade da lisozima (Egorova et al., 2017; “Lysozyme from chicken egg white for Molecular Biology,” 2013). Esta variação pode justificar a taxa de recuperação mais baixa, observada na presença deste LI.

Quando é utilizado o tampão fosfato pH 7,4, o pH da solução contendo o LI [Cho][Phe] é mantido em valores próximos de 7,4, mantendo-se desta forma o intervalo de pH ótimo da proteína, não pondo em causa a sua atividade.

Assim pode concluir-se que existem líquidos iónicos que alteram o pH do meio, e que estas oscilações de pH podem influenciar a atividade da lisozima. Tal não significa que, com o ajuste do valor de pH do meio, estes LI não venham a revelar qualidades enquanto estabilizadores de proteínas.

2.2.4 Efeito do solvente na estabilidade da proteína

Tabela 12. Valor de atividade das soluções estudadas, no ensaio 1, 2 e 3, à temperatura ambiente.

Solução em biH ₂ O	Atividade T _{amb} (U/mL)	Solução em tampão fosfato pH 7,4	Atividade T _{amb} (U/mL)
Controlo (Lisozima + Solvente)	405,85 (ensaio 1) 437,01 (ensaio 3)	Controlo (Lisozima + Solvente)	225,95
E (Lisozima + LI [Cho][Phe] + biH ₂ O)	420,26	I (Lisozima + LI [Cho][Phe] + biH ₂ O)	104,70
F / G (Lisozima + LI [Cho][Glu] + biH ₂ O)	376,86 (ensaio 1) 315,14 (ensaio 2)	J (Lisozima + LI [Cho][Glu] + biH ₂ O)	103,78

Para além da temperatura, do tempo de ensaio e do pH, a variação do solvente também parece ter uma influência na estabilidade da proteína estudada.

Antes da exposição às diferentes temperaturas, foi calculada, ao tempo zero, a atividade enzimática para todas as soluções preparadas e deste modo observou-se que a atividade enzimática inicial, nas soluções em água bidestilada é superior à atividade das soluções em tampão fosfato pH 7,4, **Tabela 12**. Este facto pode estar relacionado com o efeito da salinidade, que está descrito como um dos parâmetros que altera a estabilidade

química das proteínas. No entanto, esta alteração pode ser no sentido da estabilização ou da destabilização da proteína consoante a concentração da solução salina e a carga dos seus iões (Campos, 2005). Assim, apesar de se observar um decréscimo da atividade enzimática na presença do tampão fosfato pH 7,4, serão necessários mais estudos para compreender a influência que os sais que constituem o tampão fosfato pH 7,4 têm na estabilidade da lisozima.

Apesar de ainda muito estar por fazer, principalmente para melhor compreender as possíveis interações entre a Lisozima e os LI, os resultados deste estudo são bastante promissores, sendo indicativos de que os LI estudados possuem alguma capacidade estabilizadora da atividade desta proteína. Seria também interessante, estudar outras proteínas e a influência dos LI na sua estabilidade.

Conclusão

O trabalho experimental tinha como objetivo estudar a influência dos líquidos iónicos (2-Hidroxietil)-trimetilamonio-L-fenilalaninato, (2-Hidroxietil)-trimetilamonio-L-glutamato e Brometo de 1-hexil-3-Metilimidazolio na estabilidade das proteínas.

Neste estudo houve a necessidade de validar o método utilizado, para que os resultados fossem os mais rigorosos. Apesar de esta validação ter sido morosa, devido ao facto das proteínas serem difíceis de manipular, esta foi realizada com sucesso.

A partir dos ensaios de estabilidade realizados, pode concluir-se que o LI [Cho][Glu] apresentou taxas de recuperação de atividade enzimática superiores a 65% em todos os ensaios, destacando-se taxa calculada no ensaio 3, de 99,04% de recuperação de atividade. Perante estes resultados, pode afirmar-se que este LI parece ter um efeito estabilizador a diferentes temperaturas, diferentes tempos de exposição e ainda na presença de diferentes solventes.

No caso do líquido iónico [C6mim][Br], este apresentou uma grande capacidade estabilizadora, provavelmente devido ao tamanho da sua cadeia de alquila. Na solução que continha o LI [C6mim][Br], após uma exposição a 90 °C, a lisozima manteve uma atividade de recuperação de 91,26%.

Relativamente ao LI [Cho][Phe], a influência deste líquido foi mais notória após a manutenção do pH do meio, pela utilização de tampão fosfato pH 7,4. Isto pode dever-se ao facto de a basicidade deste LI em água bidestilada, influenciar negativamente o desempenho da lisozima. Por sua vez, em tampão fosfato pH 7,4, é possível manter o pH num intervalo que permite a manutenção da atividade da lisozima, mesmo na presença do LI [Cho][Phe]. Neste caso, os resultados demonstram que até mesmo este LI tem alguma capacidade de estabilizar a proteína estudada, havendo uma taxa de recuperação de 88,33%.

Em suma, este estudo demonstrou que dependendo das condições, todos os líquidos iónicos podem apresentar vantagens para a estabilidade da proteína, pois em todas as soluções que continham LI, o decréscimo da atividade enzimática quando expostas à elevação de temperatura, não foi tão acentuado como nas soluções que não contêm os mesmos. No entanto, são necessários mais estudos comparativos para poder seleccionar o melhor LI, e utilizar as suas propriedades físico-químicas da melhor forma.

Finalmente, é de salientar que no presente estudo os resultados obtidos referem-se à capacidade estabilizadora dos LI estudados, a concentrações não citotóxicas, o que é uma mais valia, em termos da sua aplicabilidade em sistemas de veiculação de proteínas.

Apesar de serem necessários mais estudos para melhor compreender algumas características deste potencial uso dos LI, tais como as interações entre estes sais e as proteínas e a influência da sua estrutura nessas interações, esta parece ser uma área muitíssimo promissora e desafiante na qual comunidade científica deve investir.

Bibliografia

- Adriano Cruz, Patrícia Sá, Carlos Oliveira, C. H. C. (2017). *Química, Bioquímica, Análise Sensorial e Nutrição no Processamento de Leite e Derivados: Coleção Lácteos DE 2016. Elsevier Brasil.*
- Ana P.M. Tavares, O. R. and E. A. M. (2013). World's largest Science , Technology & Medicine Open Access book publisher : In book *Ionic Liquids - New Aspects for the Future* (p. 16).
- Bak, A., Leung, D., Barrett, S. E., Forster, S., Minnihan, E. C., Leithead, A. W., ... Crocker, L. S. (2015). Physicochemical and Formulation Developability Assessment for Therapeutic Peptide Delivery—A Primer. *The AAPS Journal*, 17(1), 144–155. <https://doi.org/10.1208/s12248-014-9688-2>
- Bijelic, A., Molitor, C., Mauracher, S. G., Al-Oweini, R., Kortz, U., & Rompel, A. (2014). Hen egg-white lysozyme crystallisation: Protein stacking and structure stability enhanced by a tellurium(VI)-centred polyoxotungstate. *ChemBioChem*, 16(2), 233–241. <https://doi.org/10.1002/cbic.201402597>
- Bischof, J. C., & He, X. (2005). Thermal stability of proteins. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1066, 12–33. <https://doi.org/10.1196/annals.1363.003>
- Campos, L. S. (2005). *Entender a Bioquímica*. (E. Editora, Ed.) (5ª). Lisboa.
- Caparica, R. A. M. dos R. (2017). *THE INFLUENCE OF IONIC LIQUIDS ON THE SOLUBILITY*
- Cegielska-Radziejewska, R., Leśniewski, G., & Kijowski, J. (2008). Properties and application of egg white lysozyme and its modified preparations – a review. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 58(1), 5–10.
- Chen, X., Liu, J., & Wang, J. (2010). Ionic liquids in the assay of proteins. *Analytical Methods*, 2(9), 1222. <https://doi.org/10.1039/c0ay00342e>
- Dimitrov, D. S. (2012). Therapeutic Proteins: Methods and Protocols. *Springer Science+Business Media*, 899. <https://doi.org/10.1007/978-1-61779-921-1>
- Di Russo, N. V., Estrin, D. A., Martí, M. A., & Roitberg, A. E. (2012). pH-Dependent Conformational Changes in Proteins and Their Effect on Experimental pKas: The Case of Nitrophorin 4. *PLoS Computational Biology*, 8(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002761>
- Egorova, K. S., Gordeev, E. G., & Ananikov, V. P. (2017). Biological Activity of Ionic

- Liquids and Their Application in Pharmaceuticals and Medicine. *Chemical Reviews*, 117(10), 7132–7189. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00562>
- Fosgerau, K., & Hoffmann, T. (2015). Peptide therapeutics: Current status and future directions. *Drug Discovery Today*, 20(1), 122–128. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2014.10.003>
- Frokjaer, S., & Otzen, D. E. (2005). Protein drug stability: a formulation challenge. *Nature Reviews Drug Discovery*, 4(4), 298–306. <https://doi.org/10.1038/nrd1695>
- Gouveia, W., Jorge, T. F., Martins, S., Meireles, M., Carolino, M., Cruz, C., ... Araújo, M. E. M. (2014). Toxicity of ionic liquids prepared from biomaterials. *Chemosphere*, 104, 51–56. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.10.055>
- Jain, A., Jain, A., Gulbake, A., Shilpi, S., Hurkat, P., & Jain, S. K. (2013). Peptide and protein delivery using new drug delivery systems. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 30(4), 293–329. <https://doi.org/10.1615/CritRevTherDrugCarrierSyst.2013006955>
- Jr, K., & Vickery, J. T. (2001). *Protein Structure Stability and Folding, Theory and Practice*. Springer Science & Business Media. Totowa, NJ.
- Lindman, S., Xue, W.-F., Szczepankiewicz, O., Bauer, M. C., Nilsson, H., & Linse, S. (2006). Salting the charged surface: pH and salt dependence of protein G B1 stability. *Biophysical Journal*, 90(8), 2911–2921. <https://doi.org/10.1529/biophysj.105.071050>
- Lysozyme from chicken egg white for Molecular Biology. (2013). *SIGMA-ALDRICH*. Retrieved from <http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Datasheet/7/17651dat.Par.001.File.tmp/17651dat.pdf>
- Manning, M. C., Chou, D. K., Murphy, B. M., Payne, R. W., & Katayama, D. S. (2010). Stability of protein pharmaceuticals: An update. *Pharmaceutical Research*, 27(4), 544–575. <https://doi.org/10.1007/s11095-009-0045-6>
- Martinez Cuesta, S., Furnham, N., Rahman, S. A., Sillitoe, I., & Thornton, J. M. (2014). The evolution of enzyme function in the isomerases. *Current Opinion in Structural Biology*, 26(1), 121–130. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2014.06.002>
- Murphy, K. P. (2001). *Protein Structure, Stability, and Folding*. (Humana Press, Ed.) (1^a). Totowa, NJ.
- Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2014). *Princípios da Bioquímica de Lehninger*.

- (Artmed, Ed.) (6^a). Barcelona.
- Noritomi, H., Minamisawa, K., Kamiya, R., & Kato, S. (2011). Thermal stability of proteins in the presence of aprotic ionic liquids. *Journal of Biomedical Science and Engineering*, 4(2), 94–99. <https://doi.org/10.4236/jbise.2011.42013>
- Quintas, A., & Ana Ponces Freire, M. J. H. (2008). *Bioquímica: Organização Molecular da Vida*. Lisboa: LIDEL.
- Rod R. Seeley, Trent D. Stephens, P. T. (2013). *Anatomia e fisiologia_Seeley.pdf*.
- Santos de Almeida, T., Júlio, A., Saraiva, N., Fernandes, A. S., Araújo, M. E. M., Baby, A. R., ... Mota, J. P. (2017). Choline- versus imidazole-based ionic liquids as functional ingredients in topical delivery systems: cytotoxicity, solubility, and skin permeation studies. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 43(11), 1858–1865. <https://doi.org/10.1080/03639045.2017.1349788>
- Schröder, C. (2017). Proteins in Ionic Liquids: Current Status of Experiments and Simulations. *Topics in Current Chemistry*, 375(2). <https://doi.org/10.1007/s41061-017-0110-2>
- Talley, K., & Alexov, E. (2010). On the pH-optimum of activity and stability of proteins. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, 78(12), 2699–2706. <https://doi.org/10.1002/prot.22786>
- Victor W. Rodwell, David A. Bender, Kathleen M. Botham, Peter J. Kennelly, P. A. W. (2016). *Bioquímica Ilustrada de Harper*. (Amgar, Ed.) (30^o). Brasil. Weil, J. H. (2000). *Bioquímica Geral* (2^a). Lisboa.
- Weingärtner, H., Cabrele, C., & Herrmann, C. (2012). How ionic liquids can help to stabilize native proteins. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 14(2), 415–426. <https://doi.org/10.1039/C1CP21947B>
- Caparica, R. A. M. dos R. (2017). *THE INFLUENCE OF IONIC LIQUIDS ON THE SOLUBILITY / PERMEATION OF POORLY THE INFLUENCE OF IONIC LIQUIDS ON THE SOLUBILITY / PERMEATION OF POORLY*.
- Martinez Cuesta, S., Furnham, N., Rahman, S. A., Sillitoe, I., & Thornton, J. M. (2014). The evolution of enzyme function in the isomerases. *Current Opinion in Structural Biology*, 26(1), 121–130. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2014.06.002>